

MODULARIO
LCA - 101



PCT/TO 3 / 0 0 1 3 4
Rec'd PCT/TO 08 SEP 2004
Mod. C.E. - 1-F7
10/507145

REC'D. 08 MAY 2003
PCT

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

PCT/TO 3 / 134

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: INV. IND.

RM2002A000130 DEL 08/03.2002

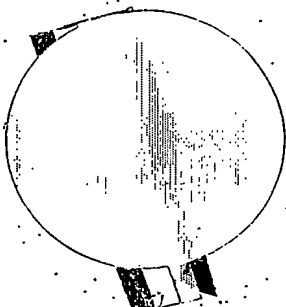


Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

06 APR. 2003

Roma, li



IL DIRIGENTE
Giampietro Carlotto
Giampietro Carlotto

BEST AVAILABLE COPY

1) RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA N.G. EIN

Residenza Sienna, (SI) codice 00273530527

2) Denominazione _____

Residenza _____ codice _____

RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Cognome e nome CAPASSO Olga ed altri Cod. fiscale _____

Denominazione studio di appartenenza Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Provincia Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) RM

2) DOMICILIO ELETTIVO destinatario Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Provincia Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) RM

3) TITOLO classe proposta (sez./cl/scl) _____ gruppo/sottogruppo _____

Mezzi diagnostici e terapeutici per la Sindrome da Ritardo Mentale legata al cromosoma X"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI NO SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

4) INVENTORI DESIGNATI cognome e nome

1) MELONI Ilaria 3) _____

2) RENIERI Alessandra 4) _____

5) PRIORITÀ

ragione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	Allegato S/R
1) _____	_____	_____	____/____/____	_____
2) _____	_____	_____	____/____/____	_____

6) CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione _____

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Doc.	N. es.	n. pag.	n. tav.	Contenuto
1)	<u>2</u>	<u>35</u>	<u>6</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
2)	<u>2</u>	<u>PROV</u>	<u>6</u>	disegno
3)	<u>0</u>	<u>RIS</u>		Lettera d' incarico
4)	<u>1</u>			designazione inventore
5)				documenti di priorità con traduzione in Italiano
6)				autorizzazione o atto di cessione
7)				nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro DUECENTONOVANTUNO /80 obbligatorio

COMPILATO IL 08/03/2002 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA

CONTINUA S/NO NO Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A. Olga Capasso

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO SI

CAMERA di COMMERCIO. IND. ART. e AGR. - 2002 A 000130 ROMA codice 58

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA _____ Reg. A

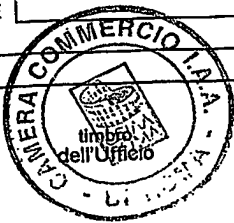
L'anno DUEMILADUE, il giorno OTTO, del mese di MARZO

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggluntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE _____

IL DEPOSITANTE

[Signature]



L'UFFICIALE ROGANTE

[Signature]

Stiva Attent



SCIoglimento RISERVE

Data	N. Protocollo
/ /	/ /
/ /	/ /

SCIoglimento RISERVE

Data	N° Protocollo
/ /	/ /
/ /	/ /
/ /	/ /
/ /	/ /

Confronta singole priorità

UN MANDATARIO per se e per gli altri
 Olga Capasso
 n° d'iscr. 820 B)

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE
NUMERO DOMANDA 2002 A 000130
NUMERO BREVETTO REG. A

PROSPETTIVA
DATA DI DEPOSITO 03 / 03 / 2002
DATA DI RILASCIO / /

A. RICHIEDENTE(I)

- 1) Denominazione
- 2) Denominazione

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA

D. TITOLO

"Mezzi diagnostici e terapeutici per la Sindrome da Ritardo Mentale legata al cromosoma X".

Classe proposta (sez./cl./scl) / /

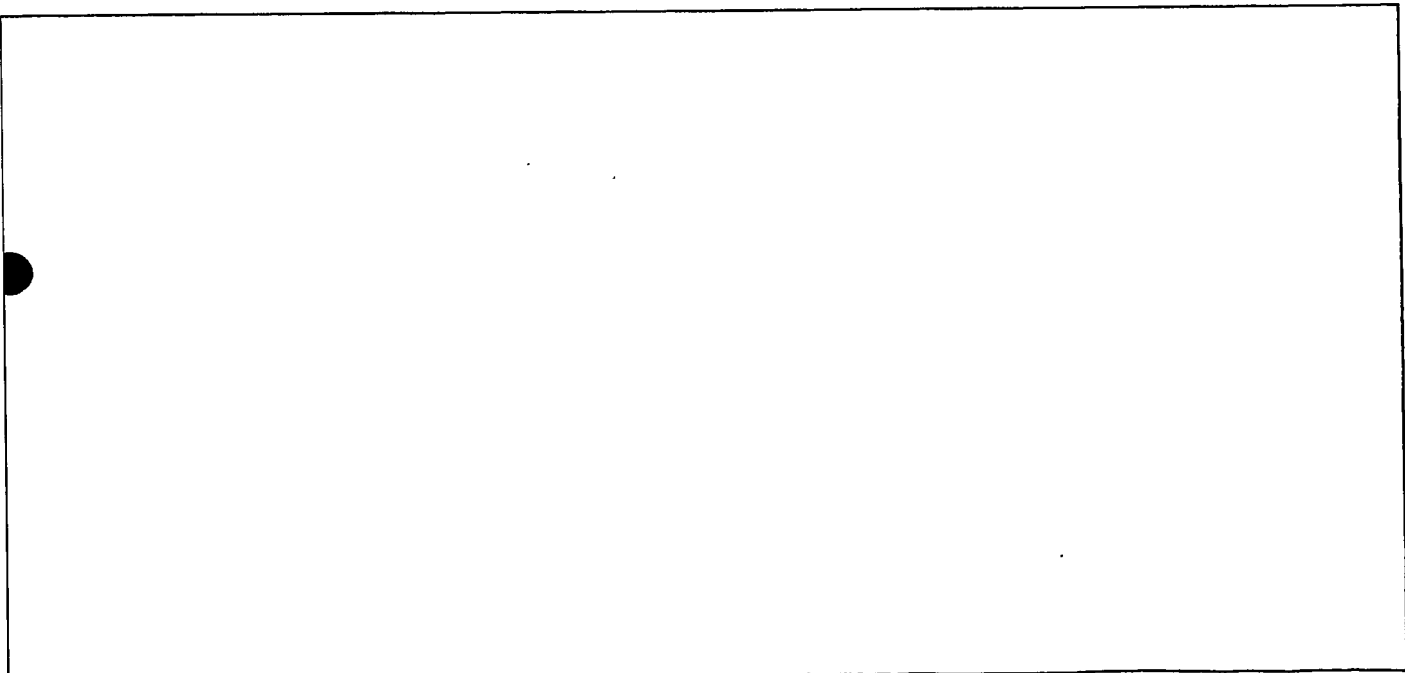
(gruppo/sottogruppo) / /

L. RIASSUNTO

E' descritto un acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene *FACL4* umano o la proteina *FACL4* o porzioni funzionali di essa per uso diagnostico o terapeutico di sindromi collegate al Ritardo Mentale. Sono descritti anche opportuni kit diagnostici.



M. DISEGNO



DESCRIZIONE **RM 2002 A 000130**

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale a titolo:

"Mezzi diagnostici e terapeutici per la Sindrome da Ritardo Mentale legata al cromosoma X"

a nome: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA

Inventori: Ilaria Meloni e Alessandra Renieri

La presente invenzione concerne mezzi diagnostici e terapeutici per la sindrome da Ritardo Mentale legata al cromosoma X.

Il ritardo mentale legato al cromosoma X (XLMR) è una condizione ereditaria in cui l'incapacità di sviluppare funzioni cognitive è dovuta a mutazioni di un gene sul cromosoma X. In un recente aggiornamento della casistica di XLMR sono stati raggruppati 136 casi di MR "sindromico" o "specifico" (MRXS) e 66 casi di MR "non specifico" (MRX) (1). Solo in 9 dei 66 casi di MRX è stato identificato il gene responsabile (1). Risulta pertanto evidente l'esigenza di identificare altri geni specifici responsabili per il ritardo mentale, sia a fini diagnostici che terapeutici.

La recente scoperta della delezione di geni contigui nella sindrome ATS-MR (sindrome di Alport e ritardo mentale) ha indotto a identificare la regione Xq22.3 come contenente un gene per il ritardo mentale (2).

Gli autori dell'invenzione hanno effettuato un'analisi comparativa dell'estensione della delezione tra pazienti affetti da ATS-MR e pazienti con solo ATS che ha portato gli autori dell'invenzione a

ING. DAZIANO & ZAPPALÀ ROMA SPA

restringere la regione potenzialmente critica per il ritardo mentale ad una di circa 380 kb, contenente almeno quattro geni. Gli autori hanno ora identificato tre mutazioni puntiformi, due missenso e una che induce una modifica del sito di "splicing", nel gene *FACL4* in tre famiglie con ritardo mentale non specifico. Un'analisi dell'attività enzimatica di linee cellulari linfoblastoidi dei tre pazienti ha dimostrato una riduzione marcata dell'attività rispetto alle cellule normali, dimostrando che tutte e tre le mutazioni sono distruttive. Tutte le femmine portatrici con mutazioni puntiformi del gene *FACL4* o con delezioni genomiche mostrano un'inattivazione del cromosoma X completamente sbilanciata, suggerendo un ruolo del gene nel conferimento di un vantaggio selettivo. *FACL4* è il decimo gene mutato associato a MRX (1) e il primo che sia coinvolto nel metabolismo degli acidi grassi.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione una molecola di acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene *FACL4* umano che codifica per una porzione funzionale della proteina *FACL4* per uso diagnostico di sindromi collegate al Ritardo Mentale.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione una molecola di acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene *FACL4* umano che codifica per una porzione funzionale della proteina *FACL4* per uso terapeutico di sindromi collegate al Ritardo Mentale.

Rientra nell'ambito dell'invenzione un metodo per evidenziare in un soggetto almeno una mutazione nel gene codificante per la proteina *FACL4* umana, localizzato sul cromosoma X, comprendente le fasi di:

- a) prelevare un campione contenente una quantità sufficiente di DNA da detto soggetto o in grado di essere riprodotto in coltura;
- b) isolare il DNA da detto campione;
- c) sottoporre detto DNA ad amplificazione esponenziale utilizzando come coppia di inneschi per la reazione di amplificazione almeno due oligonucleotidi in grado di amplificare almeno un frammento del gene *FACL4* umano, in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale della proteina *FACL4*;
- d) evidenziare in almeno un frammento amplificato eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale.

Preferibilmente la fase di amplificazione esponenziale del DNA viene effettuata utilizzando coppie di inneschi per la reazione di amplificazione in grado di amplificare tutta la porzione codificante del gene *FACL4* umano. Più preferibilmente la fase di amplificazione esponenziale del DNA per amplificare tutta la porzione codificata del gene *FACL4* umano comprende l'uso delle seguenti coppie di inneschi:

- Esone 3: 5' GTGAGCACATTTAGCTTAAG 3',
 5' ATCAATTGTGCTATCAACTTG 3';
- Esoni 3 e 4: 5' CTTCTTCAGCACAATAAGGC 3',
 5' GCATACTTAAAACGCACTCG 3';
- Esone 5: 5' CCGCTCATAGCTTCTGTATG 3',
 5' AACCAATTCTCACATGCAAGC 3';
- Esoni 6 e 7: 5' AGACTGACTTCAATAATATCC 3',



- 5' TCATTTGTTTCCCTAACCTAC 3';
- Esome 8: 5' ATTGATAGCTTATCGTTATGC 3',
5' AATGCTGAACATGAACTCTG 3';
- Esome 9: 5' ATGATAAAGCTCTTGGTATTTTC 3',
5' TGCAGCATCATACGATCATG 3';
- Esome 10: 5' AATTCCAAGTGTAACCTTCTG 3',
5' TAAAAGGTCCAAGTACGATC 3';
- Esome 11: 5' ACTGTCTCCATTCTTTTCAG 3',
5' ACCTTATGATCATGGTGGTG 3';
- Esome 12: 5' GAGGAATCTTTCCAGAGC 3',
5' ATTAGTAGCAGCTGATACAG 3';
- Esome 13: 5' TATTCCCAGTGCATTGGTAC 3',
5' GAAAGTCATAAAGCTGACAG 3';
- Esome 14: 5' CTAATGTTCTCTCATAAAGTG 3',
5' GAACTAATGGAACCATCAAC 3';
- Esome 15: 5' CAGTCAGAATTGCATATACC 3',
5' AAGAGAAGACTATGTTACCC 3';
- Esome 16: 5' TTGGAATTATCTGTACTIONGTAC 3',
5' AGCCTAATGCAAAAGACATC 3';
- Esome 17: 5' ACTCCTTTCTCGTCTCTTTTC 3',
5' TAGAGGTTGAAAACCACCAG 3'.

REG. MINIST. SANITÀ ROMA C.

In una forma preferita di attuazione, la fase di evidenziare in almeno un frammento amplificato eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale avviene per sequenza diretta o per metodica SSCP.

Costituisce ulteriore oggetto dell'invenzione un kit diagnostico per sindromi collegate al Ritardo Mentale per attuare il metodo descritto sopra comprendente:

- a) almeno una coppia di oligonucleotidi innesco per la reazione di amplificazione esponenziale di almeno un frammento del gene *FACL4* umano, in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale della proteina *FACL4*;
- b) un DNA di controllo da soggetto non affetto da Ritardo Mentale legato al cromosoma X.

Preferibilmente le coppie di oligonucleotidi innesco per la reazione di amplificazione sono in grado di amplificare tutta la regione codificante del gene *FACL4*.

Costituisce ulteriore oggetto dell'invenzione la proteina *FACL4* o porzione funzionale di essa per uso diagnostico di sindromi collegate al Ritardo Mentale.

Costituisce ulteriore oggetto dell'invenzione la proteina *FACL4* o porzione funzionale di essa per uso terapeutico di sindromi collegate al Ritardo Mentale.

Rientra nell'ambito dell'invenzione un metodo per la determinazione dell'attività enzimatica della proteina *FACL4* in un campione biologico comprendente le fasi di:

- a) prelevare il campione biologico da un soggetto, in cui il campione è compreso nel gruppo di: fluidi biologici, cellule linfoblastoidi lisate;

b) incubare il campione in opportuna miscela di reazione comprendente acido arachidonico;

c) rivelare la produzione eventuale di arachidonil-CoA.

In una forma preferita la rivelazione di arachidonil-CoA avviene a mezzo di utilizzo di acido arachidonico marcato, alternativamente con metodiche cromatografiche, come HPLC, o spettrofotometriche.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un kit diagnostico per sindromi collegate al Ritardo Mentale per attuare il metodo descritto sopra comprendente:

- Tampone di lisi, con eventualmente opportuni inibitori di proteasi e/o agenti riducenti;
- Coenzima A e Adenosina 5'trifosfato (ATP);
- Acido arachidonico freddo e acido arachidonico marcato con ^{14}C .

L'invenzione verrà ora descritta in riferimento a sue forme di attuazione esplicative ma non limitative, facendo riferimento alle seguenti figure:

Fig. 1 Cromatogrammi delle sequenze mutate

a) Mutazione nell'esone 15 del probando T22 della famiglia MRX63. b) Mutazione nell'introne 10 del probando P55. I cromatogrammi si riferiscono all'elica antisenso. Al di sopra del cromatogramma sono riportati sia il cambio nucleotidico che amminoacidico. Le basi introniche sono indicate in lettere minuscole. Wt = sequenza wild type; m= sequenza mutata.

Fig. 2 Analisi della segregazione.

E' mostrata un'analisi di SSCP con apparato GenePhor (Pharmacia-Biotech). Gli alberi genealogici sono illustrati al di sopra delle linee. Una freccia indica il proposito di ciascuna famiglia. I numeri al di sotto dei simboli indicano la percentuale di inattivazione dell'X. C= Controllo. Il punto interrogativo nell' albero genealogico superiore, vicino la femmina I13, si riferisce all'incerto fenotipo di questa femmina: il suo attuale basso IQ potrebbe derivare, almeno in parte, da una diversa patologia che associa ritardo mentale e atassia (Tabella 1). Una punta di freccia indica il conformomero mutato.

a) Prodotto di PCR dell'esone 15 dalla famiglia MRX63. Gli inneschi usati sono: 5'CAGTCAGAATTGCATATACC3' e 5'AAGAGAAGACTATGTTACCC3'.

b) Prodotto di PCR dell'esone 11 e delle sequenze introniche fiancheggianti dalla famiglia del probando P55. Gli inneschi usati sono: 5'ACTGTCTCCATTTCCTTTCAG3' e 5'ACCTTATGATCATGGTGGTG3'.

Fig. 3 Rappresentazione schematica della proteina *FACL4* (a) e comparazione dei motivi caratterizzanti le Acil CoenzimaA sintetasi (FACS) (b).

a) Il peptide N-terminale neuro-specifico (ellisse) è seguito dai due domini della luciferasi (LR1 e LR2) contenenti il dominio di legame all'AMP (riquadro a strisce) e il motivo caratterizzante le FACS (riquadro grigio), rispettivamente.

b) Le sequenze normali e mutanti sono allineate con la sequenza consenso (lunga 25 aminoacidi) dei FACS. L'amminoacido mutato nella famiglia MRX63 è evidenziato in grigio. I tre amminoacidi la cui

sostituzione causa la perdita di attività enzimatica nella acil Co-A Sintetasi di *E. Coli* sono messi in riquadro (9).

Fig. 4 RT-PCR sul probando P55.

- a) Sequenza normale intorno alla giunzione introne 10-esone 11. Notare il sito criptico di splicing. Una freccia indica il sito di mutazione.
- b) Gel di poliacrilammide al 6% del prodotto di RT-PCR dall'esone 10 all'esone 12. Il prodotto di RT-PCR atteso di 290 bp è slittato a 318 bp nell' RNA mutato. c= controllo; p= paziente. c) RNA normale e mutante. Gli amminoacidi sono indicati al di sotto dei nucleotidi. Nell'RNA mutato si trova un codone di stop (TAA, indicato in grassetto) dopo sei codoni anormali derivanti da sequenze introniche.

Fig. 5 Attività dell'arachidonil CoA sintetasi dei mutanti e dei controlli.

Saggi per l'attività dell'arachidonil CoA sintetasi su lisati di cellule intere di 3 controlli normali (C1-C3), dei pazienti P55 e T22, del paziente ATSMR e di sua madre (femmina portatrice con delezione genomica). I grafici mostrano l'attività media da saggi effettuati in triplicato. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La valutazione statistica tra i gruppi è stata fatta con il test di Student ($p = 0.001$).

Fig. 6 Espressione di *FACL4* nell'ippocampo e nel cervelletto umano.

Colorazione con immunoperossidasi (marrone chiaro). Controcolorazione con ematossilina di Mayer (violetto).

- a) Sezione di ippocampo (x640). Cellule del giro dentato (a sinistra, ingrandite in c) e cellule Piramidali (a destra, ingrandite in d) che mostrano una forte immunoreattività citoplasmatica.



ING. PIERLUIGI ZAMBINO ROMA

b) Sezione cerebellare (x640). Reattività delle cellule di Purkinje e delle cellule dello strato granulare; nello strato molecolare si notano cellule sparse immunoreattive e processi allungati debolmente reattivi (parte distale dei dendriti delle cellule di Purkinje) (punta di freccia).

c) Ingrandimento maggiore del giro dentato (x 1500).

d) Cellule piramidali dell'ippocampo con una densa colorazione citoplasmatica (x 1500). I nuclei non reattivi sono chiaramente delineati da un anello più denso (indicato con una punta di freccia).

e) Ingrandimento maggiore della stessa regione di sezione cerebellare in b (x 1500) che mostra la colorazione citoplasmatica continua dal soma fino ai dendriti delle cellule di Purkinje (punta di freccia). Il nucleo è circondato da un sottile anello intensamente reattivo.

Metodi

Valutazione fisica e psicométrica della famiglia MRX63

Un accurato e completo esame fisico è stato eseguito sui pazienti I1, I2, II2, II3, II4, III1, III2, III3, III4, IV1. Non è stato possibile esaminare alcun maschio sano. La valutazione psicométrica è stata effettuata in nove soggetti di questa famiglia inclusi due maschi affetti (I2, II2) e sette femmine (portatrici: I1, II3, II4, III1, III2 e omozigoti normali: III3, III4). La "Columbia Mental Maturity Scale" (18) è stata usata per la determinazione dell' IQ. Inoltre, specifiche capacità sono state attribuite con test appropriati, come il linguaggio espressivo (19), la memoria verbale (Digit Span delle McCarthy Scales for Children's Abilities (MSCA) (20), la memoria spaziale (21) e la strutturazione spazio-visiva (Copying geometrical shapes, MSCA). Sono state valutate

anche alcune funzioni esecutive, come la fluenza verbale (MSCA), la selettività visiva (22) e la resistenza agli impulsi (Luria's Test). Il ritardo mentale è stato diagnosticato in presenza di tutti i seguenti criteri: capacità intellettive significativamente al di sotto della media (IQ \leq 70) (criterio A), significative limitazioni nelle funzioni di adattamento (criterio B) e insorgenza prima del 18esimo anno di età (criterio C) (23). La femmina III4 aveva un IQ basso (56), ma non soddisfaceva gli altri criteri e conseguentemente non è stata considerata "affetta". Il soggetto IV1, un bambino, non è stato esaminato dal neuropsicologo, ma precedenti valutazioni indicavano un ritardo mentale da grave a moderato, con un IQ di 37 (Brunet-Lezine).

Isolamento dell' RNA e RT-PCR

E' stata usata la procedura con TRIZOL (Life Technologies) per l'isolamento di RNA da linfoblasti trasformati con EBV del probando P55 e di individui di controllo. La sintesi del cDNA è stata effettuata in un volume di reazione di 20 μ l con RNA totale (1-2 μ g), inneschi specifici (5'ATGAATCGGTGTGTCTGAGG3', 5'ATCCCATGGAGATGTTCTGTC3') (1 μ M ciascuno), dNTP (2mM), inibitori dell' RNAsi (5U) e MMLV-RT (25U) (Advanced Biotechnologies LTD, Epsom, UK). Gli inneschi e l'RNA sono stati pre-incubati a 70°C per 5 min, e poi sono stati aggiunti gli altri reagenti e la reazione è stata incubata a 42°C per 60 min e a 75°C per 10 min. I cDNA sono stati amplificati con inneschi sull'esone 10 (5'GGAAGCAAAGGAACTGTAC3') e sull'esone 12 (5' ATGAATCGGTGTGTCTGAGG 3').

Analisi mutazionale dei pazienti

Sono state esaminate per sequenza diretta 12 famiglie correlate a larghe regioni del cromosoma X comprendenti Xq22.3 (da Xq21 a Xq26), raccolte dall'European XLMR Consortium: 3 provenienti da Nijmegen (N9, N32, N50), 3 da Parigi (P4, P14, P15), 5 da Tours (T11, T18 = MRX66, T19, T22 = MRX63, T40) e 1 da Leuven (L17). Il sequenziamento diretto è stato effettuato in entrambe le direzioni con il kit "Big dye terminator cycle sequencing" (Applied Biosystems) con un ABI 310 Automated Sequencer e le sequenze sono state analizzate con il software Genescan. Sono state inoltre analizzate 107 famiglie la cui ereditarietà X-legata era stata stabilita in base all'analisi dell'albero genealogico: 45 provenienti da Nijmegen, 41 da Parigi, 9 da Leuven e 12 da Berlino. In tutte le famiglie erano state escluse altre cause di MR (fenotipo normale, valori neurologici normali, cariotipo normale, valori metabolici normali, esclusione di FRAXA per studi molecolari con *FMR1*). Erano tutte classificate come altamente suggestive di una ereditarietà X-legata sulla base della presenza di almeno due maschi affetti e di trasmissione materna. Inoltre i pazienti di tutte le famiglie sono stati esaminati da membri del consorzio XLMR. In queste 107 famiglie l'analisi è stata effettuata con la tecnica del SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) (29). Per questa tecnica i prodotti di PCR degli esoni codificanti di *FACL4* (da 3 a 17) vengono denaturati e sottoposti ad elettroforesi su un gel di poliacrilammide al 6% o su gradiente 6-12.5% (GeneGelExcel Kit Pharmacia); il DNA viene successivamente evidenziato con colorazione argentica. La tecnica si

basa sul principio che un'alterazione nella sequenza nucleotidica causa una migrazione alterata del DNA a singolo filamento, che risulta quindi avere un pattern diverso rispetto al DNA non alterato. Successivamente sono state inoltre esaminate per sequenza diretta altre 4 famiglie provenienti da Leuven: due con una diagnosi di ritardo mentale non specifico X-legato (L22 e L46) e due con diagnosi di paraplegia spastica X-legata (L49 e L56). Per tutte e quattro era stata stabilita una correlazione ad ampie regioni del cromosoma X comprendenti Xq22.3 (da Xp11.4 a Xq26.1). Gli esoni codificanti di *FACL4* (da 3 a 17), comprendenti entrambi i codoni di inizio alternativi localizzati sugli esoni 3 e 4 (5), sono stati amplificati con inneschi specifici. Gli inneschi sono i seguenti:

Esone 3: 5' GTGAGCACATTTAGCTTAAG 3'
 5' ATCAATTGTGCTATCAACTTG 3'

Esoni 3 e 4: 5' CTTCTTCAGCACAATAAGGC 3'
 5' GCATACTTAAAACGCACTCG 3'

Esone 5: 5' CCGCTCATAGCTTCTGTATG 3'
 5' AACAATTCTCACATGCAAGC 3'

Esoni 6 e 7: 5' AGACTGACTTCAATAATATCC 3'
 5' TCATTTGTTTCCCTAACCTAC 3'

Esone 8: 5' ATTGATAGCTTATCGTTATGC 3'
 5' AATGCTGAACATGAACTCTG 3'

Esone 9: 5' ATGATAAAGCTCTTGGTATTTTC 3'
 5' TGCAGCATCATACGATCATG 3'

Esone 10: 5' AATTCCAAGTGTA ACTTCTG 3'



DR. PAOLO ZANARDI ROMA SP

5' TAAAAGGTCCAAGTACGATC 3'

Estone 11: 5' ACTGTCTCCATTCCCTTTCAG 3'

5' ACCTTATGATCATGGTGGTG 3'

Estone 12: 5' GAGGAATCTTTCCCAGAGC 3'

5' ATTAGTAGCAGCTGATACAG 3'

Estone 13: 5' TATTCCCAGTGCATTGGTAC 3'

5' GAAAGTCATAAAGCTGACAG 3'

Estone 14: 5' CTAATGTTCTCTCATAAAGTG 3'

5' GAACTAATGGAACCATCAAC 3'

Estone 15: 5' CAGTCAGAATTGCATATACC 3'

5' AAGAGAAGACTATGTTACCC 3'

Estone 16: 5' TTGGAATTATCTGTACTGTAC 3'

5' AGCCTAATGCAAAAGACATC 3'

Estone 17: 5' ACTCCTTTCTCGTCTCTTTC 3'

5' TAGAGGTTGAAAACCACCAG 3'

Analisi dell'inattivazione dell'X

Per valutare lo stato di inattivazione dell'X nella madre del probando P55, è stato usato il saggio descritto da Pegoraro et al. (24), con il quale si saggia lo stato di metilazione del repeat polimorfico CAG nel gene del recettore degli androgeni, usando l'enzima di restrizione metilazione-sensibile HpaII. I prodotti di PCR del DNA digerito e non digerito sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide al 6% seguita da colorazione con argento. L'intensità delle bande è stata misurata con il programma Diversity Database (Biorad) e i valori ottenuti sono stati corretti per l'amplificazione preferenziale di un allele (24).

Saggio dell'attività di *FACL4* su cellule linfoblastoidi

Per saggiare l'attività di *FACL4* su lisati di cellule intere è stato usato il saggio descritto da Malhotra et al. (28). In breve, l'attività enzimatica è stata determinata misurando la formazione di (1-¹⁴C)-arachidonil-CoA da acido arachidonico marcato con 1-¹⁴C. I lisati cellulari di 10⁸ cellule linfoblastoidi sono stati incubati per 20 min in 0.15 ml di una miscela di reazione contenente 15 µmol TRIS/HCl, pH 8.0, 1 µmol ATP, 100 nmol CoA, 750 nmol ditiotritolo, 3 µmol MgCl₂ e 40 µl di una soluzione di 50 mM NaHCO₃, 7.5 mM Triton X-100, 10 nmol acido arachidonico e 2x10⁵ d.p.m. acido arachidonico marcato. La reazione è stata bloccata con 2.25 ml propan-2-olo:eptano:acido solforico 2 M (40:10:1), seguito da 1.5 ml eptano e 1 ml acqua con agitazione vigorosa. Dopo la centrifugazione (5 min a 2000 g) la fase superiore è stata rimossa, e la fase acquosa lavata tre volte con 2 ml di eptano. La radioattività nelle fasi superiori (eptano) e inferiori (acquoso) è stata determinata per lettura con un β-counter (Beckman).

Anticorpo anti-*FACL4*

Un anticorpo policlonale anti-*FACL4* è stato ottenuto in coniglio con il peptide sintetico "KAKPTSDKPGSPYRS", corrispondente ad un frammento ammino-terminale ad elica, altamente immunogenico; della proteina *FACL4* umana. L'anticorpo è stato purificato per affinità e usato come anticorpo primario (diluizione 1:2000). In un saggio di immunoblotting questo anticorpo riconosce una proteina delle dimensioni attese assente nel fegato. Poiché tutti i membri della

RESEARCH

famiglia FACL, ad esclusione di FACL4, sono espressi nel fegato questo saggio prova la specificità dell'anticorpo per FACL4.

Colorazione immunohistochimica

E' stata effettuata una colorazione con immunoperossidasi su sezioni in paraffina di ippocampo e cervelletto di soggetti adulti normali (ottenute dal Servizio di Patologia dell'Università di Siena). Le sezioni, spesse 5 µm, sono state deparaffinate e reidratate. Il blocco della perossidasi endogena è stato ottenuto per incubazione in 3% H₂O₂/metanolo per 10 min.; le sezioni sono state pre-incubate in 1.5% BSA/PBS per 1 ora RT; l'incubazione in anti-FACL4 1:200 in PBS-BSA è stata effettuata per tutta la notte a 4°C. L'anticorpo secondario coniugato con HRP (SIGMA-ALDRICH), diluito 1:200 in PBS-BSA, è stato incubato per 1h RT. Il 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloreuro (SIGMA-ALDRICH) è stato usato come cromogeno; le sezioni sono state controcolorate con ematossilina di Mayer, deidratate e montate con Histomount. I vetrini di controllo negativo sono stati ottenuti omettendo l'anticorpo primario. I vetrini sono stati osservati e fotografati ad un microscopio ottico DM Leitz.

Risultati

Gli autori hanno già descritto una sindrome complessa con delezione di geni contigui caratterizzata da sindrome di Alport, Ipoplasia mediofaciale, Ritardo mentale e Ellissocitosi (AMME, OMIM # 300194) dovuta ad una delezione di 2 Mb in Xq22.3 (2,6). Dopo l'identificazione della prima famiglia, gli autori hanno identificato una seconda famiglia con una delezione più piccola di circa 1 Mb che presentava sindrome di



Alport (ATS) e ritardo mentale, proponendo la denominazione ATS-MR (sindrome di Alport e Ritardo Mentale). Questa sindrome si aggiunge alla sindrome ATS-DL (sindrome di Alport e Leiomiomatosi diffusa). In entrambe le sindromi è coinvolto il gene *COL4A5*, responsabile per ATS, ma mentre ATS-DL si estende centromericamente, ATS-MR si estende telomericamente rispetto al gene del collagene. Un'analisi comparativa dell'estensione della delezione tra i pazienti affetti da sindrome ATS-MR e quelli affetti da ATS isolata ha permesso agli autori di limitare la regione critica per il ritardo mentale a circa 380 Kb. Questa regione contiene quattro geni: *FACL4*, *KCNE5*, *NXT2* e *GUCY2F*.

Gli autori hanno effettuato un'analisi di mutazione in questi quattro geni in pazienti con ritardo mentale isolato. Un'analisi per sequenziamento diretto è stata effettuata in 12 pazienti provenienti da famiglie non correlate nelle quali segregava un ritardo mentale non specifico, collegato a regioni del cromosoma X comprensive della regione Xq22.3 (da Xq21 a Xq26) (7,8). In un paziente, T22, è stata trovata una mutazione puntiforme, c.1585 C>A, nell'esone 15 del gene *FACL4*, codificante per l'acil-CoA sintetasi di tipo 4 per gli acidi grassi a catena lunga (Fig. 1a). Per determinare la frequenza di mutazioni nel gene *FACL4* nel ritardo mentale legato al cromosoma X, l'analisi di mutazioni è stata successivamente estesa ad ulteriori 107 pazienti maschi non correlati affetti da XLMR. In un paziente, P55, è stata trovata una mutazione nel sito 3' di splicing dell'introne 10 di *FACL4* (c.1003-2A>G) (Fig. 1b). Tutte e due le mutazioni sono assenti in 300 controlli normali (600 cromosomi).

DIREZIONE GENERALE DI SANITÀ PUBBLICA SPA

Il paziente T22 appartiene ad una famiglia già riportata come MRX63. Il locus MRX in questa famiglia era stato mappato tra DXS990 e DXS1227 (Xq21.33-Xq27.1) con un Z_{max}/θ_0 di 2.14 a DXS1001 (8). I maschi affetti mostravano un deficit mentale non-specifico, non-progressivo senza attacchi epilettici, da moderato a grave (Tabella 1). Nelle femmine portatrici sono state osservate capacità cognitive molto variabili, da un ritardo mentale moderato ad una intelligenza normale (I2, II4, III1, tutte IQ > 75). I maschi affetti e le femmine portatrici mentalmente ritardate mostravano un particolare fenotipo cognitivo, non riscontrato né in portatrici non ritardate, né in una femmina non portatrice con un basso IQ (56) ma con un buon adattamento sociale (III4). Questo profilo cognitivo è caratterizzato da (i) difficoltà di strutturazione spazio-visiva e (ii) deficit delle funzioni esecutive con una debole facilità di parola, un'impulsività motoria e un deficit dell'attenzione selettiva. L'esame neurologico era normale, evidenziando solo riflessi leggermente alterati (Tabella 1). Inoltre la femmina portatrice II3, con deficit mentale moderato, rivelava, a seguito di esami clinici ripetuti, delle caratteristiche neurologiche che suggerivano una progressiva degenerazione cerebellare non osservata nei parenti, a prescindere dal loro stato di portatori. Una MRI mostrava una sostanziale atrofia cerebellare. Particolari caratteristiche osservate in alcuni maschi affetti o in femmine portatrici, così come in alcuni parenti sani, comprendevano ptosi unilaterale (III2, III4), apice nasale marcato (I2, II2, II3, III1, III4) e anse digitali (I2, II3, II4, III1, III2, III4). Il

peso e il volume dei testicoli era normale nei maschi affetti, così come la morfologia facciale, delle mani e dei piedi.

Il paziente P55 appartiene ad una piccola famiglia mai pubblicata. I tre maschi affetti sono di 10, 7 e 5 anni. In tutti e tre i casi la gravidanza e il parto erano stati normali, così come lo sviluppo motorio. I ragazzi non presentano caratteristiche dismorfiche. Precocemente era stato notato un significativo ritardo nel parlare, che era peggiorato col tempo: il fratello più giovane è al momento in grado di dire poche parole, il fratello maggiore ha cominciato l'associazione di due parole all'età di 6 anni. L'esame neurologico era normale in tutti e non vi erano fenomeni di epilessia. La determinazione dell' IQ era stata tentata, ma senza successo a causa del grave ritardo nella parola e delle difficoltà a comprendere le istruzioni. Il ritardo mentale era stato stimato come grave. Nel fratello più giovane i primi segni erano stati rilevati a 18 mesi con un ritardo a parlare. Alla stessa età era stata osservata una iperattività. La MRI era normale. Ad un recente esame clinico il paziente presenta iperattività, perdita di attenzione, e incapacità a concentrarsi. Questi problemi di comportamento sono assenti nei due fratelli affetti. La madre sembra normale, ma nessuna stima accurata del suo IQ è stata effettuata.

In entrambe le famiglie le mutazioni co-segregano con la malattia (Fig. 2a e 2b). La mutazione c.1585C>A della famiglia MRX63 porta alla sostituzione dell'arginina 529 (R570 della isoforma cerebrale) con una serina, all'interno del motivo di 25 residui caratterizzante le acil-CoA sintetasi (FACS), comune alle FACS sia eucariotiche che

procariotiche. L'arginina 529 corrisponde all'arginina 23 del consenso (Fig. 3). Una mutagenesi sito-specifica dell'acil-CoA sintetasi di *E. Coli* ha dimostrato che la sostituzione dell'arginina corrispondente (arginina 453) abolisce completamente l'attività enzimatica (9). La mutazione c.1003-2A>G identificata nel paziente P55 rivela un sito di splicing criptico localizzato 28 bp a monte del sito di splicing corretto (Fig.4a). L'mRNA mutato contiene 28 nucleotidi aggiuntivi tra l'esone 10 e l'esone 11 con un codone di stop "in-frame" (Fig. 4b,c). Ciò produce una proteina prematuramente troncata e con 6 amminoacidi non corretti dopo la prolina 334. La proteina dovrebbe mancare del secondo dominio per la luciferasi (LR2), contenente il dominio catalitico con il dominio caratterizzante le FACS.

Tutte le sei femmine portatrici della famiglia MRX63 mostravano una inattivazione dell'X completamente sbilanciata nei leucociti (8). In maniera simile, tre femmine portatrici su tre appartenenti a due diverse famiglie ATS-MR mostravano una inattivazione dell'X completamente sbilanciata nei leucociti (3). Gli autori hanno testato anche la madre portatrice del paziente P55, ottenendo gli stessi risultati. In tutti i casi informativi l'inattivazione sbilanciata dell'X è a favore dell'X normale. La scoperta di un'inattivazione dell'X completamente sbilanciata nelle due famiglie con mutazioni puntiformi di *FACL4* qui descritte suggerisce fortemente che lo stesso gene che causa MR conferisce anche un vantaggio selettivo nei leucociti. Ciò è in accordo con il ruolo anti-apoptotico di *FACL4* (10). Lo stato di inattivazione dell'X saggiato nel sangue non è correlato con lo stato clinico delle femmine poiché



almeno una portatrice è affetta nella famiglia MRX63. Questo risultato non è completamente inatteso. Vi sono sempre maggiori evidenze che il fenotipo neurocognitivo non è ben correlato con l'inattivazione dell'X saggiata nel sangue (si veda, per es. la sindrome di Rett; 11,12). Una spiegazione di ciò potrebbe essere che l'inattivazione dell'X è misurata nel sangue, e lo stato potrebbe essere diverso nel cervello o potrebbe essere stato diverso in un momento critico dello sviluppo.

Le acil-CoA sintetasi sono una famiglia di enzimi che catalizzano la formazione dell'acil-CoA da acidi grassi, ATP e coenzima A. Poiché *FACL4* è espresso nei linfociti (5), gli autori hanno saggiato l'attività enzimatica su linee cellulari linfoblastoidi dei probandi T22 e P55, di un maschio affetto di una famiglia ATS-MR (#850) e di controlli normali. Poiché *FACL4* ha un'alta preferenza di substrato per l'acido arachidonico, gli autori hanno utilizzato questo acido grasso come substrato. Il saggio enzimatico è stato effettuato su un lisato cellulare, includendo anche il lisato cellulare di una femmina portatrice con la delezione genomica. Come atteso, le cellule linfoblastoidi mostravano un'attività normale, a causa dell'inattivazione completamente sbilanciata dell'X.

Successivamente sono state analizzate per sequenza diretta altre 4 famiglie: due con una diagnosi di ritardo mentale non specifico X-legato (L22 e L46) e due con diagnosi di paraplegia spastica X-legata (L49 e L56). In uno dei 4 pazienti, L46, è stata individuata una mutazione puntiforme, c.1001 C>T, nell' esone 10 di *FACL4*. Il paziente L46 appartiene ad una famiglia già riportata come MRX68 (XLMR

UFF. ITALIANO BREVETTI E MARCHI SPA

Genes Update Web Site: <http://xlmr.interfree.it/XLMR/Tab5.html>). Il locus MRX in questa famiglia era stato mappato tra DXS8020 e DXS1220 (Xq21.33-Xq23). La mutazione c.1001C>T porta alla sostituzione della prolina 334 con una leucina all'interno del primo dominio luciferasico (LR1) della proteina. La prolina 334 è conservata in tutte le proteine FACL umane e murine note. La mutazione segrega con la malattia nella famiglia e non è stata trovata in 50 controlli normali (100 cromosomi). L'analisi dell'attività enzimatica effettuata su cellule linfoblastoidi del paziente ha evidenziato anche in questo caso una drammatica riduzione dell'attività rispetto ai controlli, dimostrando che la mutazione riscontrata è patogenetica. Anche in questa famiglia le femmine portatrici presentano uno sbilanciamento completo dell'inattivazione del cromosoma X.

Nell'uomo sono state identificate cinque forme di FACL. *FACL4* codifica per una proteina di 670 amminoacidi espressa in diversi tessuti ad eccezione del fegato, il tessuto principale di azione sia di *FACL1* che di *FACL2* (5). Nel cervello codifica un trascritto più lungo, risultante da uno splicing alternativo che produce una isoforma specifica per il cervello contenente 41 amminoacidi N-terminali idrofobici aggiuntivi (Numeri di accesso in GenBank: Y12777 per la forma ubiquitaria e Y13058 per la forma cervello-specifica) (5). La localizzazione putativa prevista dal programma PSORT varia dal citosol (0,45 di probabilità), alla membrana del reticolo endoplasmatico (0,82 di probabilità), se i 41 amminoacidi sono aggiunti alla proteina.

Per determinare il pattern di espressione della proteina FACL4 normale e attribuirle una localizzazione subcellulare, gli autori hanno effettuato esperimenti di immunostochimica su cervello umano adulto usando un anticorpo policlonale per un peptide sintetico. FACL4 è espresso ad alti livelli nel cervello umano, specialmente nel cervelletto e nell'ippocampo, con una distribuzione molto simile a quella ottenuta nel topo (13) (Fig.6). Le cellule dello strato piramidale dell'ippocampo mostrano una forte colorazione citoplasmatica del soma; anche il sottile anello citoplasmatico delle cellule granulari del giro dentato è reattivo. Una forte colorazione citoplasmatica è evidente anche nel soma delle cellule di Purkinje e granulari del cervelletto. Anche la regione prossimale dendritica delle cellule di Purkinje è immunoreattiva. I risultati mostrano che FACL4 è espresso in maniera specifica nei neuroni, essendo le cellule gliali completamente negative. All'interno dei neuroni, la localizzazione è nel soma e nella regione prossimale dei dendriti. La proteina sembra ampiamente diffusa nel citoplasma (i nuclei sono sempre negativi) con un accumulo presso la membrana nucleare. Questa particolare distribuzione potrebbe essere dovuta alla presenza dei 41 aminoacidi N-terminali che localizzano l'enzima nella membrana nucleare esterna.

Un possibile meccanismo per il quale la ridotta produzione di arachidonil-CoA provochi ritardo mentale potrebbe essere correlato al suo ruolo nella trasduzione del segnale tramite la regolazione dei flussi ionici, per es. di ioni Ca^{2+} . Nel muscolo scheletrico, la ridotta azione sul rilascio del Ca^{2+} da parte del canale di rilascio del Ca^{2+} sensibile alla

ide. BAZZANO & ZANARDI ROMA SPA

rianodina nei tubuli longitudinali e nelle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico, potrebbe essere responsabile dell'ipotonia neonatale e infantile comune ai maschi affetti da ATS-MR e ai maschi della famiglia MRX63 (14). Un meccanismo alternativo potrebbe essere correlato all'apoptosi (10). La sovra-espressione di *FACL4* in cellule EcR293 protegge dall'apoptosi indotta da acido arachidonico. D'altronde, l'inibizione dell'attività di *FACL4* promuove l'apoptosi indotta da acido arachidonico (10). L'assenza nelle linee germinali di una funzionalità di *FACL4* potrebbe portare ad una precoce apoptosi nei neuroni e all'alterazione dello sviluppo cerebrale.

Fino ad ora 9 geni sono stati associati al ritardo mentale non specifico legato all'X (MRX) (1). Uno è il gene adiacente al sito fragile X-E (*FRAXE*) in Xq28, denominato *FMR2*, che codifica una proteina nucleare che potrebbe essere un regolatore trascrizionale. Tre geni, oligofrenina-1 (*OPHN1*) in Xq12, *PAK3* in Xq21.3-q24 e *ARHGEF6* in Xq26, codificano per proteine coinvolte nel ciclo della GTPasi Rho, che media l'organizzazione del citoscheletro, la forma e la motilità cellulare e potrebbe essere responsabile della crescita assonale e della forma e dimensione dei dendriti. *GDI1*, in Xq28, è coinvolto nel ciclo delle vescicole sinaptiche e nel rilascio di neurotrasmettitori. *TM4SF2* (alias *MSX1*), in Xp11.4, interagisce con le integrine beta-1 e potrebbe avere un ruolo nel controllo della crescita neuritica. *IL1RAPL1*, in Xp22.1-Xp21.3, è omologo alle proteine accessorie del recettore dell'interleuchina-1. Infine, due geni già associati a sindromi, di Coffin-Lowry e di Rett, sono coinvolti anche nel MR non specifico: *RPS6KA3*

(*RSK2*) e *MECP2*, coinvolti nella via di segnalazione delle MAP chinasi e nel silenziamento genico, rispettivamente (15-17). *FACL4* è il decimo gene mutato nel ritardo mentale non specifico legato all'X (MRX) ed il primo coinvolto nel metabolismo degli acidi grassi. Le mutazioni in *FACL4* potrebbero giustificare circa l'1% del ritardo mentale non specifico legato all'X nei maschi. Una normale omeostasi dei lipidi risulta quindi critica per il corretto sviluppo e/o funzionamento del sistema nervoso centrale.

Kit Diagnostici per la sindrome MRX

Kit per saggio funzionale (il metodo è descritto nella sezione Materiali e

Metodi)

- Soluzione 1 (Tampone di lisi): Tris-HCl pH 7,5 20mM; Sodio Cloruro 140mM; EDTA 5 mM; Magnesio Cloruro 1mM; Sodio Pirofosfato 10mM.
- NP-40
- Leupeptina
- Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF)
- Coenzima A
- Adenosina 5' trifosfato (ATP)
- Ditiotritolo
- Magnesio Cloruro
- Tris-HCl pH 8 100mM
- Soluzione 2: Bicarbonato di Sodio 50mM; Triton X-100 7,5mM
- Acido Arachidonico freddo
- Acido Arachidonico marcato con ^{14}C .



UNIVERSITÀ DEL SALENTO
 DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

- Soluzione 3: 2-Propanolo/n-Eptano/Acido Solforico (40:10:1)
- n-Eptano

Kit per evidenziare mutazioni tramite SSCP o sequenza diretta (il metodo è descritto nella sezione Materiali e Metodi)

1. Per la fase di PCR:

- Taq Polimerasi termostabile
- Magnesio cloruro
- Tampone specifico per la polimerasi
- Desossinucleotidi trifosfato
- Inneschi specifici (sequenze a pp. 12-13)
- DNA di controllo da soggetto non affetto da Ritardo Mentale legato al cromosoma X.
- Agarosio per la visualizzazione dei prodotti di amplificazione.

2. Per la SSCP:

- Gel in gradiente di Poliacrilammide (Pharmacia-Biotech) per apparato GenePhor.
- Reagenti per colorazione argentica: Etanolo assoluto; Acido Nitrico; Nitrato di Argento; Carbonato di Sodio; Formaldeide; Acido Acetico.

3. Per la sequenza diretta:

- Oligonucleotidi (gli stessi utilizzati per la PCR)
- Kit per sequenza diretta (kit "Big dye terminator cycle sequencing" (Applied Biosystems).

TABELLA 1. Dati diagnostici della famiglia MPX63

Paziente (sesso)	IQ	Livello di autonomia	Difficoltà di linguaggio	Deficit nella strutturazione spazio-visiva/ funzioni esecutive	Comportamento/ umore	Segni neurologici	Circonferenza del cranio	Cifosi/ Scoliosi	Ipotonia infantile	MRI	Ellissociosi
IIA (M)	<40	ridotto	-	+	-	↑riflessi	-1,2SD	+	+	nt	nt
II2 (M)	50	basso	+	+	ansietà marcata	↓riflessi	-2SD	+	+	normale	no
II3 (F)	46	ridotto	+	+	depressione	↑riflessi	normale	-	-	atrofia cerebellare	nt
III2 (F)	48	basso	+	+	ansietà marcata	↑riflessi	-4SD	-	-	normale	no
IVI (M)	37	basso	-	nt	autistico	↑riflessi	normale	-	-	nt	nt

n.t. = non testato

BIBLIOGRAFIA

1. Chiurazzi, P., Hamel, B.C.J. & Neri, G. XLMR genes: update 2000. *Eur J Hum Genet* **9**, 71-81 (2001).
2. Jonsson, J. *et al.* Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia, and elliptocytosis: a new X-linked contiguous gene deletion syndrome? *J Med Genet* **35**, 273-278 (1998).
3. Meloni, I. *et al.* Alport syndrome and mental retardation: clinical and genetic dissection of the contiguous gene deletion syndrome in Xq22.3 (ATS-MR). *J Med Genet* in press (2001).
4. Piccini, M. *et al.* KCNE1 like gene is deleted in AMME contiguous gene syndrome: identification and characterisation of the human and mouse homologous. *Genomics* **60**, 251-257 (1999).
5. Piccini, M. *et al.* *FACL4*, a new gene encoding Long Chain Acyl-CoA Synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis and mental retardation. *Genomics* **47**, 350-358 (1998).
6. Vitelli, F. *et al.* Identification and characterization of a highly conserved protein absent in the Alport S. (A), Mental retardation (M), Midface hypoplasia (M), and Elliptocytosis (E), contiguous gene deletion syndrome. *Genomics* **55**, 335-340 (1999).
7. des Portes, V. *et al.* X-linked nonspecific mental retardation (MRX) linkage studies in 25 unrelated families: the European XLMR consortium. *Am J Med Genet* **85**, 263-265 (1999).
8. Raynaud, M. *et al.* Systematic analysis of X-inactivation in 19 XLMR families: extremely skewed profiles in carriers in three families. *Eur J Hum Genet* **8**, 253-258 (2000).



9. Black, P., Zhang, Q., Weimar, J. & DiRusso, C. Mutational analysis of a fatty Acyl-Coenzyme A Synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *Biol Chem* **272**, 4896-4903 (1997).
10. Cao, Y., Pearman, A.T., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. & Prescott, S.M. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 11280-11285 (2000).
11. Zappella, M., Meloni, I., Longo, I., Hayek, G. & Renieri, A. Preserved Speech Variants of the Rett Syndrome: Molecular and Clinical Dissection. *Am J Med Genet* **104**, 14-22 (2001).
12. Nielsen, J.B. *et al.* MECP2 mutations in Danish patients with Rett syndrome: High frequency of mutations but no consistent correlations with clinical severity or with the X chromosome inactivation pattern. *Eur J Hum Genet* **9**, 178-184 (2001).
13. Cao, Y., Murphy, K.J., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A. & Prescott, S.M. Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *FEBS letters* **467**, 263-267 (2000).
14. Faergeman, N.J. & Knudsen, J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signaling. *Biochem J* **323**, 1-12 (1997).
15. Merienne, K. *et al.* A missense mutation in RPS6KA3 (RSK2) responsible for non-specific mental retardation. *Nature Genet* **22**, 13-14,(L) (1999).

DIREZIONE REGIONALE SANITARIA SPA

16. Meloni, I. *et al.* A mutation in the Rett syndrome gene, MECP2, causes X-linked mental retardation and progressive spasticity in males. *Am J Hum Genet* **67**, 982-985 (2000).
17. Couvert, P. *et al.* MECP2 is highly mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* **10**, 941-946 (2001).
18. Burgemeister, B., L., H.-B. & Lorge, I. *Manual for the use of the Columbia Mental Maturity Scale* (The Psychological Corporation, New York, 1954).
19. Goodglass, H. & Kaplan, E. *Boston Diagnostic Aphasia Examination* (Psychological Assessment Resources, Odessa, 1983).
20. McCarthy, D. *Manual for the McCarthy scales of children's abilities* (S.L.: The Psychological Corporation, New York, 1972).
21. Wechsler, D. *Wechsler Memory Scale-Revised Manual*. (The Psychological Corporation, New York, 1987).
22. Gauthier, L., Dehaut, F. & Joannette, Y. The Bell test: A quantitative and qualitative test for visual neglect. *Int J Clin Neuropsychol* **11**, 49-54 (1989).
23. Association, A.P. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM-IV* (American Psychiatric Association, Washington (DC), 1994).
24. Pegoraro, E. *et al.* Detection of new paternal dystrophin gene mutations in isolated cases of dystrophinopathy in females. *Am J Hum Genet* **54**, 989-1003 (1994).
25. Stuhlsatz-Krouper, S.M., Bennett, N.E. & Schaffer, J.E. Substitution of alanine for serine 250 in the murine fatty acid transport

protein inhibits long chain fatty acid transport. *J Biol Chem* **273**, 28642-50 (1998).

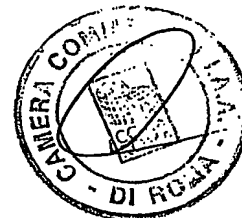
26. Tanaka, T., Hosaka, K. & Numa, S. Long-chain acyl-CoA synthetase from rat liver. *Methods in Enzymology* **71**, 334-41 (1981).

27. Watkins, P.A. *et al.* Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* *FAT1* gene decreases very long-chain fatty acyl-CoA synthetase activity and elevates intracellular very long-chain fatty acid concentrations. *J Biol Chem* **273**, 18210-9 (1998).

28. Malhotra, K.T., Malhotra, K., Lubin, B.H. & Kuypers, F.A. Identification and molecular characterization of acyl-CoA synthetase in human erythrocytes and erythroid precursors. *Biochem J* **344**, 135-143 (1999).

29. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning*, ed. 2. Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

Olga Capasso
 UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso
 (N° d'iscr. 820 B)



IRE BAZZANO & ZAPPALÀ ROMA SPA

RIVENDICAZIONI

1. Acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene *FACL4* umano in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale della proteina *FACL4* per uso diagnostico di sindromi collegate al Ritardo Mentale.
2. Acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene *FACL4* umano in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale della proteina *FACL4* per uso terapeutico di sindromi collegate al Ritardo Mentale.
3. Metodo per evidenziare in un soggetto almeno una mutazione nel gene codificante per la proteina *FACL4* umana, localizzato sul cromosoma X, comprendente le fasi di:
 - e) prelevare un campione contenente una quantità sufficiente di DNA da detto soggetto o in grado di essere riprodotto in coltura;
 - f) isolare il DNA da detto campione;
 - g) sottoporre detto DNA ad amplificazione esponenziale utilizzando come coppia di inneschi per la reazione di amplificazione almeno due oligonucleotidi in grado di amplificare almeno un frammento del gene *FACL4* umano, in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale della proteina *FACL4*;
 - h) evidenziare in almeno un frammento amplificato eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale.



4. Metodo secondo la rivendicazione 3 in cui la fase di amplificazione esponenziale del DNA viene effettuata utilizzando coppie di inneschi per la reazione di amplificazione in grado di amplificare tutta la porzione codificante del gene *FACL4* umano.
5. Metodo secondo la rivendicazione 4 in cui la fase di amplificazione esponenziale del DNA per amplificare tutta la porzione codificate del gene *FACL4* umano comprende l'uso delle seguenti coppie di inneschi:

Estone 3: 5' GTGAGCACATTTAGCTTAAG 3',
 5' ATCAATTGTGCTATCAACTTG 3';

Esoni 3 e 4: 5' CTTCTTCAGCACAATAAGGC 3',
 5' GCATACTTAAAACGCACTCG 3';

Estone 5: 5' CCGCTCATAGCTTCTGTATG 3',
 5' AACAATTCTCACATGCAAGC 3';

Esoni 6 e 7: 5' AGACTGACTTCAATAATATCC 3',
 5' TCATTTGTTTCCCTAACCTAC 3';

Estone 8: 5' ATTGATAGCTTATCGTTATGC 3',
 5' AATGCTGAACATGAACTCTG 3';

Estone 9: 5' ATGATAAAGCTCTTGGTATTTTC 3',
 5' TGCAGCATCATACGATCATG 3';

Estone 10: 5' AATTCCAAGTGTAACCTTCTG 3',
 5' TAAAAGGTCCAAGTACGATC 3';

Estone 11: 5' ACTGTCTCCATTTCCTTTCAG 3',
 5' ACCTTATGATCATGGTGGTG 3';

Estone 12: 5' GAGGAATCTTTCCAGAGC 3',

- 5' ATTAGTAGCAGCTGATACAG 3';
- Estone 13: 5' TATTCCCAGTGCATTGGTAC 3',
5' GAAAGTCATAAAGCTGACAG 3';
- Estone 14: 5' CTAATGTTCTCTCATAAAGTG 3',
5' GAACTAATGGAACCATCAAC 3';
- Estone 15: 5' CAGTCAGAATTGCATATACC 3',
5' AAGAGAAGACTATGTTACCC 3';
- Estone 16: 5' TTGGAATTATCTGTACTGTAC 3',
5' AGCCTAATGCAAAAGACATC 3';
- Estone 17: 5' ACTCCTTTCTCGTCTCTTTC 3',
5' TAGAGGTTGAAAACCACCAG 3'.

6. Metodo secondo le rivendicazioni da 3 a 5 in cui la fase di evidenziare in almeno un frammento amplificato eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale avviene per sequenza diretta o per metodica SSCP.
7. Kit diagnostico per sindromi collegate al Ritardo Mentale per attuare il metodo secondo le rivendicazioni da 3 a 6 comprendente:
- c) almeno una coppia di oligonucleotidi innesco per la reazione di amplificazione esponenziale di almeno un frammento del gene *FACL4* umano, in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale della proteina *FACL4*;
 - d) un DNA di controllo da soggetto non affetto da Ritardo Mentale legato al cromosoma X.

8. Kit secondo la rivendicazione 7 in cui le coppie di oligonucleotidi innescano per la reazione di amplificazione sono in grado di amplificare tutta la regione codificante del gene *FACL4*.
9. Proteina *FACL4* o porzione funzionale di essa per uso diagnostico di sindromi collegate al Ritardo Mentale.
10. Proteina *FACL4* o porzione funzionale di essa per uso terapeutico di sindromi collegate al Ritardo Mentale.
11. Metodo per la determinazione dell'attività enzimatica della proteina *FACL4* in un campione biologico comprendente le fasi di:
- d) prelevare detto campione biologico da un soggetto, in cui il campione è compreso nel gruppo di: fluidi biologici, cellule linfoblastoidi lisate;
 - e) incubare detto campione in opportuna miscela di reazione comprendente acido arachidonico;
 - f) rivelare la produzione eventuale di arachidonil-CoA.
12. Metodo secondo la rivendicazione 11 in cui la rivelazione di arachidonil-CoA avviene a mezzo di utilizzo di acido arachidonico marcato.
13. Kit diagnostico per sindromi collegate al Ritardo Mentale per attuare il metodo secondo le rivendicazioni 11 o 12 comprendente:
- Tampone di lisi, con eventualmente opportuni inibitori di proteasi e/o agenti riducenti;
 - Coenzima A e Adenosina 5'trifosfato (ATP);
 - Acido arachidonico freddo e acido arachidonico marcato con ^{14}C .

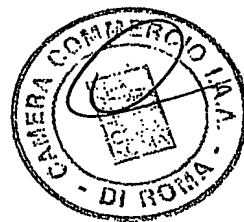
Roma,

p.p.: Università degli Studi di Siena

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

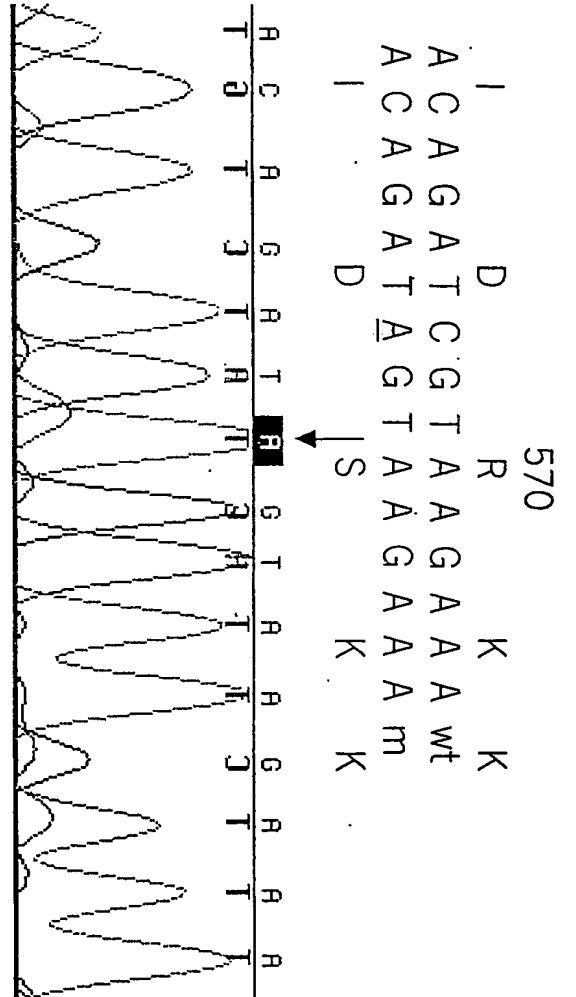
OLGA CAPASSO

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
ROMA



RM 2002 A 000130

a)

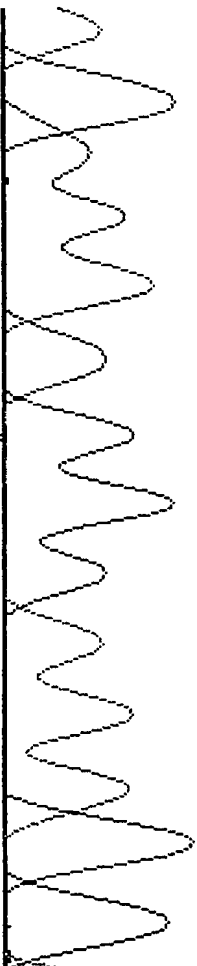


334
 E . I

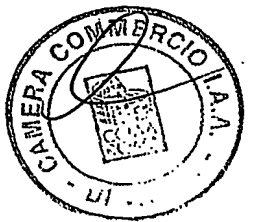
a c t t t c a g g g a a a t t c w t
 a c t t t c g g g a a a t t c m



A C T T T C G G A A T T A T A C
 T A R R N H a J J J T A T H a



b)



UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso

Fig. 1



RM 2002 A 000130

b)

a)

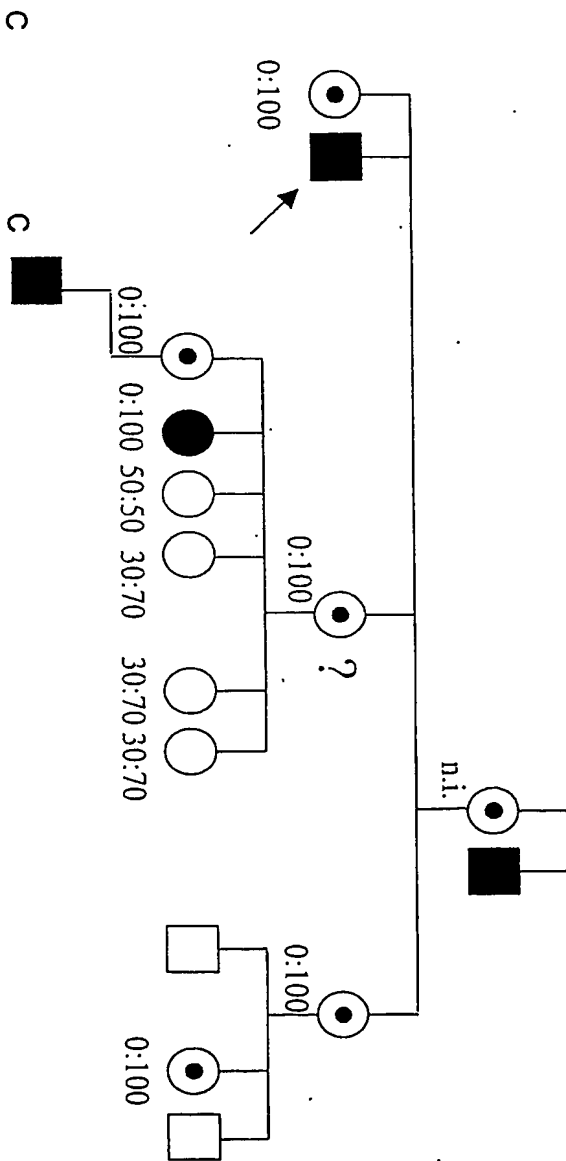
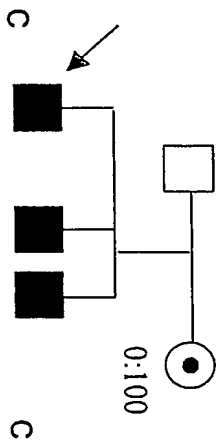
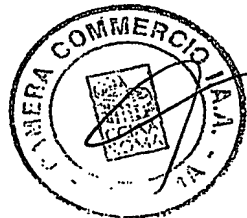


Fig. 2

p.p.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

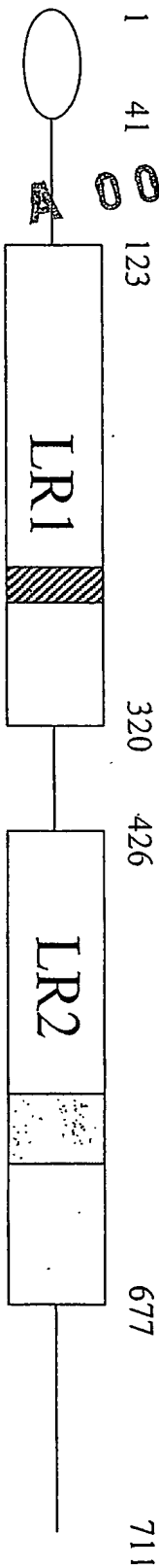
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
Via d'Isola 820 RI



10

a

RM 2002 A 000130



b

<i>FACL4</i> normal	546	N	G	Q	R	W	F	C	T	G	D	I	G	E	F	H	P	D	G	C	L	Q	I	I	D	R	K	K	572
<i>FACL4</i> mutant	546	N	G	Q	R	W	F	C	T	G	D	I	G	E	F	H	P	D	G	C	L	Q	I	I	D	S	K	K	572
FACS consensus	1	D	G	-	-	W	L	H	T	G	D	I	G	X	W	X	P	X	G	X	L	K	I	I	D	R	K	K	25



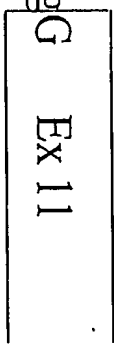
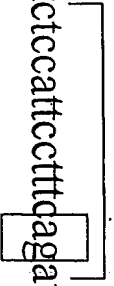
Fig. 3

DM 2002 A 000130

a)

cryptic site

actgtctccattcctttcagattattgatatatttgtttaacttcag



c p

— 318

— 290

b)

normal

Ex 10	Ex 11
A V P E I M	

mutant

Ex 10	att att gaa tat ttt gtt taa ctt tca g	Ex 11
-------	---------------------------------------	-------

c)

A V P I I E Y F V X

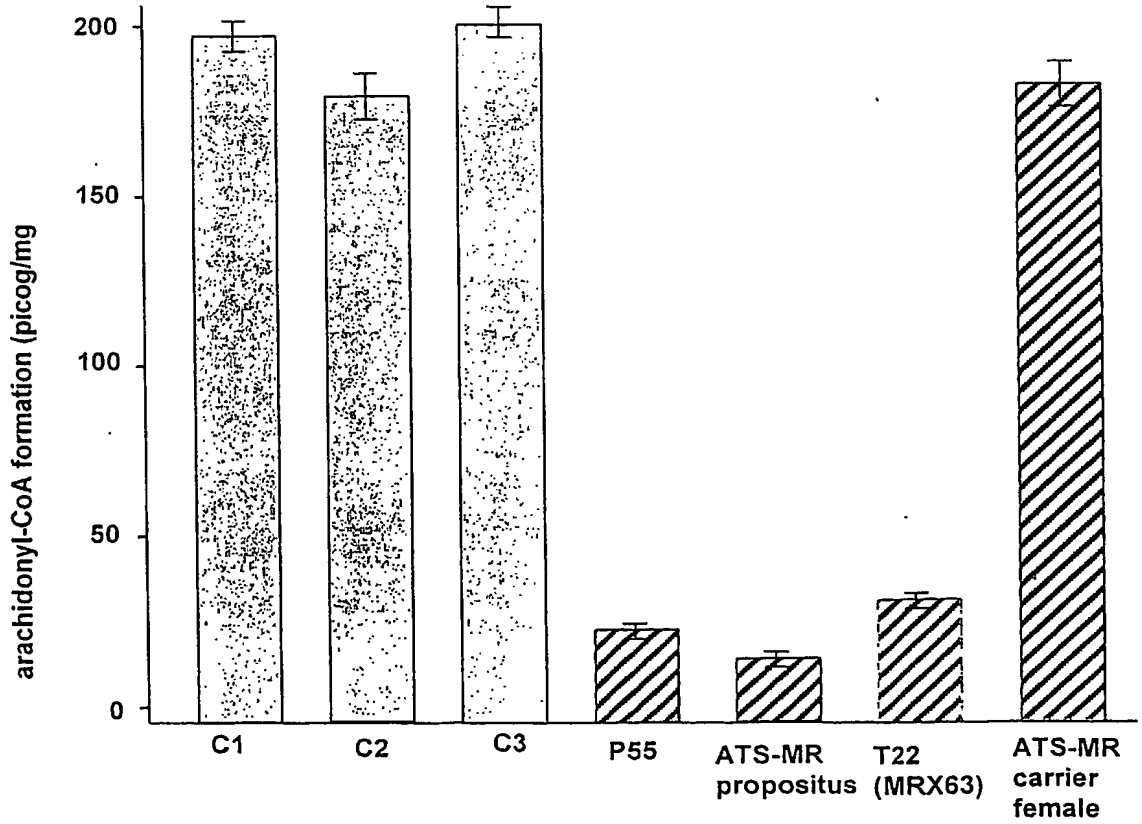
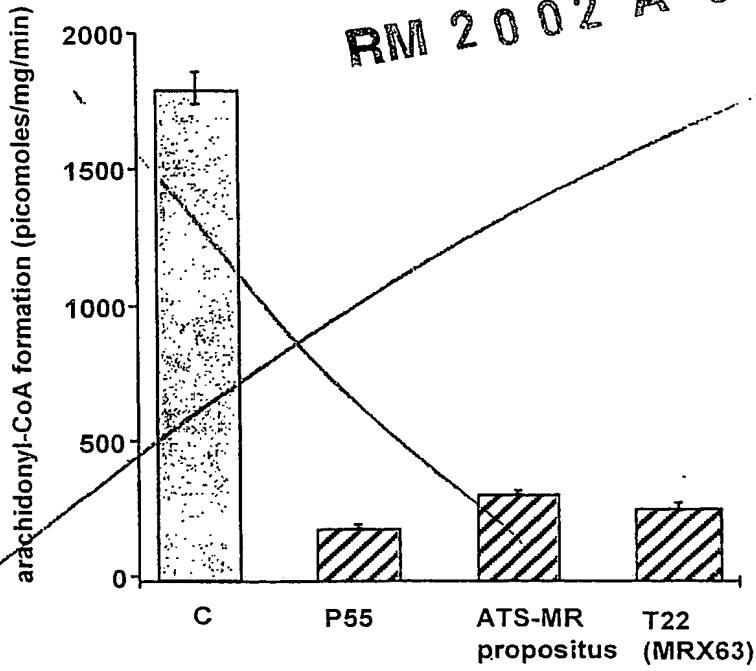


UN MANDATARIO per se e per gli altri Olga Capasso

Fig. 4

RM 2002 A 000130

a)



ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

Fig. 5





RM 2002 A 000130

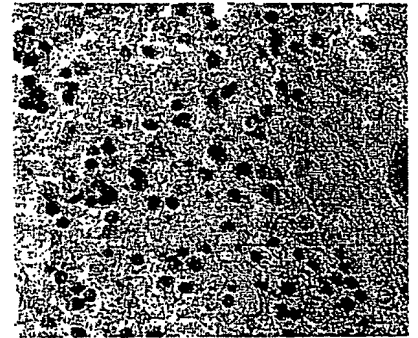
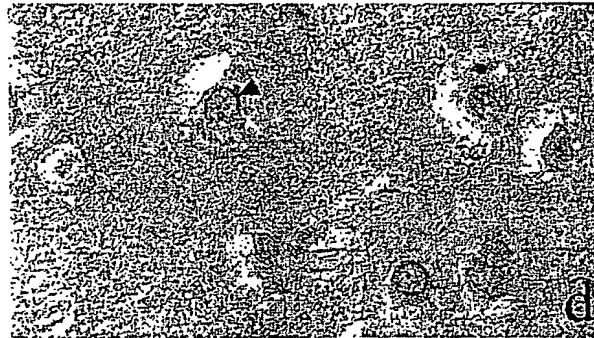
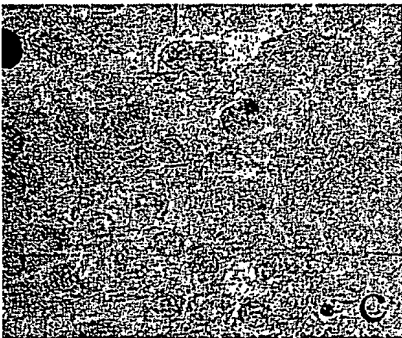
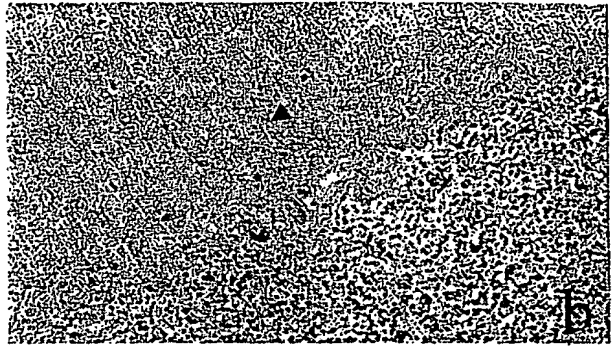
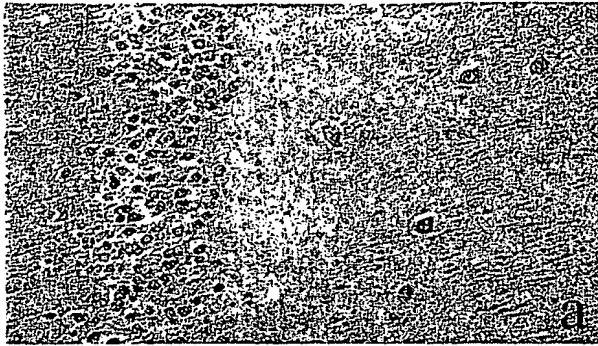


Fig. c

D.P.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA
ING. BARZANO & ZANARDO ROMA S.P.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso

